



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00		(11) Numéro de publication internationale: WO 97/06271
A1		(43) Date de publication internationale: 20 février 1997 (20.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01178 (22) Date de dépôt international: 25 juillet 1996 (25.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/09587 7 août 1995 (07.08.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHOULIKA, André [LB/FR]; 3, rue François-Mouthon, F-75015 Paris (FR). NICOLAS, Jean-François [FR/FR]; 39, chemin de la Source, F-78590 Noisy-le-Roi (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NATURAL OR SYNTHETIC RETROELEMENT SEQUENCE ENABLING NUCLEOTIDE SEQUENCE INSERTION INTO A EUKARYOTIC CELL

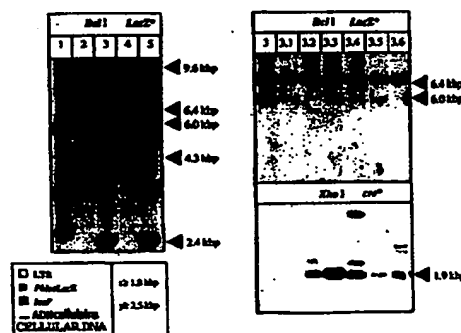
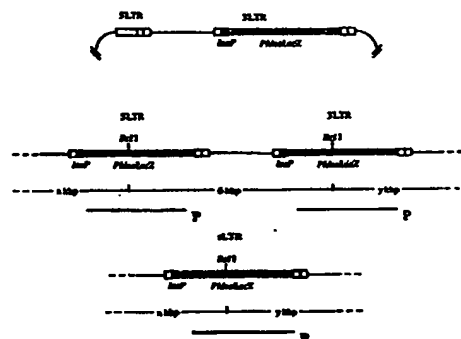
(54) Titre: SEQUENCE DE RETROELEMENTS NATURELS OU SYNTHETIQUES AYANT POUR FONCTION DE PERMETTRE L'INSERTION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DANS UNE CELLULE EUKARYOTE

(57) Abstract

Retroviral vectors contain *cis*-acting viral elements for the expression, encapsidation, reverse transcription and integration of the retroviral genome nucleic acid sequence. However, said elements are not useful in the integrated provirus and may cause many problems. A retroviral vector is provided for eliminating most of the viral elements. Said vector uses, *inter alia*, the bacteriophage P1 Cre-*lox* recombination system. The 32-nucleotide *loxP* site is inserted into 3'LTR sequence U3 with the gene to be inserted into the cell. After *loxP* duplication using the LTR, the LTRs may be recombined by enzyme Cre. The structure of the resulting provirus in the host genome corresponds to a single LTR carrying a single copy of the gene to be inserted into the cell. If the Cre expression unit is inserted between the two LTRs, only single-LTR proviral structures are found following infection with the retroviral vector.

(57) Abrégé

Les vecteurs rétroviraux contiennent des éléments viraux agissant en *cis* pour obtenir l'expression, l'encapsidation, la transcription inverse et l'intégration de la séquence d'acide nucléique du génome rétroviral. Ces éléments ne sont toutefois pas utiles dans le provirus intégré et peuvent être la cause de nombreux problèmes. L'invention concerne un vecteur rétroviral qui élimine la majorité de ces éléments viraux. Ce vecteur exploite entre autres le système de recombinaison Cre-*lox* du bactériophage P1. Le site *loxP* à 32 nucléotides est inséré à l'intérieur de la séquence U3 de la 3'LTR avec le gène à introduire dans la cellule. Suite à la duplication de *loxP* par l'intermédiaire de la LTR, les LTR peuvent être recombinés par l'enzyme Cre. La structure du provirus qui en résulte dans le génome hôte correspond à une seule LTR portant une copie unique du gène à introduire dans la cellule. Si l'unité d'expression de Cre est insérée entre les deux LTR, on ne trouve que des structures provirales à LTR unique à la suite d'une infection avec le vecteur rétroviral.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Botswana	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

SEQUENCE DE RETROELEMENTS NATURELS OU
SYNTHETIQUES AYANT POUR FONCTION DE PERMETTRE
L'INSERTION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DANS
UNE CELLULE EUCARYOTE

5

La présente invention concerne une séquence de rétroéléments naturels ou synthétiques, particulièrement une séquence de nucléotides rétrovirale LTR, plus particulièrement d'ADN rétroviral ainsi qu'un vecteur rétroviral contenant cette séquence et permettant, lors de l'infection d'une cellule à laquelle on souhaite intégrer un gène d'intérêt contenu dans ce vecteur, l'élimination d'une grande partie des séquences provirales qui ne sont plus nécessaires après l'intégration du provirus recombinant.

Les récents progrès dans l'utilisation des rétrovirus en tant que vecteurs de gènes entrent dans trois catégories : (i) amélioration des lignées cellulaires d'encapsidation, (ii) manipulation du tropisme des protéines de l'enveloppe, (iii) expression de gènes multiples. La modification de la structure du provirus intégré n'a pas encore été très exploitée parce que cette dernière contient certains éléments essentiels agissant en *cis*. Ces éléments sont la source de multiples problèmes.

Du point de vue de la structure, le système de vecteur rétroviral est construit sur deux éléments : les gènes transcomplémentants (*gag*, *pol* et *env*), et les séquences agissant en *cis* (U3, R, U5, la piste polypurine (PPT), le site de liaison de l'amorce (PBS) et le signal d'encapsidation et de dimérisation).

Les gènes transcomplémentants sont incorporés dans des cellules transcomplémentantes. Ils ne sont pas transférés vers les cellules cibles.

Les séquences agissant en *cis* sont incorporées dans des vecteurs rétroviraux. La plupart d'entre elles sont transférées vers les cellules cibles infectées et sont intégrées dans le provirus recombinant. L'élimination de n'importe laquelle de ces séquences agissant en *cis* aboutit à un système rétroviral non-fonctionnel. Le signal d'encapsidation est nécessaire pour

l'encapsidation du génome rétroviral dans des particules virales. PBS, PPT et R sont requis pour la transcription inverse. Les séquences U3 et U5 sont indispensables pour la transcription inverse et pour l'intégration du produit rétroviral introduit dans la cellule.

5 Une fois le provirus intégré, ces séquences ne sont plus nécessaires pour l'expression du gène. Au contraire, ces séquences peuvent même être la cause de nombreux problèmes. (i) Une interférence transcriptionnelle peut résulter de la présence du promoteur fort dans les séquences U3. (ii) Le PBS peut agir comme un élément inhibiteur en *cis*
10 pour les promoteurs internes. Par exemple, dans les cellules pluripotentes, le PBS est une séquence de reconnaissance pour un répresseur fort et en plus il agit comme un élément inhibiteur. (iii) La séquence U3 contient au moins un des éléments de régulation négative situés dans les activateurs à distance répétés directs entre -345 et -306. (iv) La LTR3' (long terminal
15 repeat) peut activer des gènes flanquant des cellules avec parfois des conséquences délétères pour la cellule. (v) L'ARN exprimé à partir du promoteur de la LTR5' contient le signal d'encapsidation, et peut, par conséquent, être récupéré dans une particule rétrovirale. Cet ARN peut se recombinaison avec un ARN cellulaire ou l'ARN rétroviral d'un phénotype,
20 aboutissant à la récupération d'un rétrovirus doté de nouvelles propriétés (créant un danger biologique potentiel). Ces problèmes n'ont pas encore été entièrement surmontés puisque tous ces éléments sont nécessaires pour la réplication et l'insertion du virus dans le génome.

Dans le contexte de la présente invention, les inventeurs ont
25 développé une séquence de rétroéléments naturels ou synthétiques, notamment une séquence de nucléotides rétrovirale, et particulièrement un vecteur rétroviral comprenant cette séquence, conçue de façon à permettre l'élimination d'une grande partie des séquences provirales qui ne sont plus nécessaires après l'intégration d'un provirus dans une cellule hôte. Plus
30 particulièrement, cette séquence rétrovirale est un ADN rétroviral pouvant permettre l'intégration d'une seule séquence LTR, d'un rétrotransposon, ou

une séquence comprenant une région U3, R ou U5 dans le génome d'une cellule hôte.

L'invention concerne également les cellules hôtes, de préférence des cellules eucaryotes, obtenues après transfection par la séquence de rétroéléments de l'invention ou un vecteur la contenant.

La présente invention concerne donc une séquence de rétroéléments caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'insertion incorporée dans une région pouvant être transférée dans une cellule cible et intégrée dans un provirus recombinant lors de l'infection de cette cellule cible par un rétrovirus comprenant cette séquence. Particulièrement, cette séquence d'insertion est incorporée dans une région agissant en cis, plus particulièrement, dans la région LTR3' ou LTR5' et de façon préférée dans la région U3 du LTR3' ou U5 du LTR5' de cette séquence rétrovirale. Cette séquence d'insertion comprend une séquence de nucléotides d'intérêt pouvant être intégrée dans le génome d'une cellule hôte ainsi qu'une séquence de reconnaissance pour une recombinaise. De façon préférée, l'ensemble de la séquence rétrovirale ne contient qu'une seule séquence de reconnaissance située avec la séquence d'intérêt, en amont ou en aval par exemple, bien que ce dernier paramètre ne soit pas absolument nécessaire. La séquence de nucléotides d'intérêt peut être située en aval de la séquence de reconnaissance dans la mesure où cette dernière est comprise dans la région transférée dans une cellule cible lors de l'infection de cette cellule cible par un rétrovirus contenant la séquence rétrovirale. La longueur maximale de la séquence d'insertion que le vecteur rétroviral de l'invention contient se situe normalement entre 0,5 et 10 kb.

De façon particulière, la séquence de l'invention comprend également une séquence d'ADN codant pour une recombinaise susceptible de reconnaître la séquence de son site de reconnaissance, cette séquence d'ADN codant pour une recombinaise étant avantageusement située entre les régions LTR5' et LTR3' du vecteur. L'invention concerne également un

vecteur rétroviral ou rétrovirus recombinant comprenant la séquence décrite ci-dessus. De façon préférée, le vecteur rétroviral, qui peut se présenter sous forme de rétrovirus recombinant, ne contient qu'une seule séquence de reconnaissance incorporée dans la région pouvant être transférée à une cellule cible.

L'ADN de l'invention permet donc l'insertion, par l'entremise d'un vecteur rétroviral, de séquences de nucléotides d'intérêt dans des cellules hôte, par exemple de type eucaryote, sans que soient insérées des séquences provirales qui ne sont plus nécessaires après l'intégration des séquences d'intérêt dans le provirus.

Le terme « séquence de nucléotides d'intérêt » utilisé ci-dessus fait référence à des séquences à insérer dans le génome de cellules hôtes pour ainsi permettre à celles-ci de produire des molécules d'intérêt, plus particulièrement en thérapie ou pour la vaccination. Ces séquences d'intérêt incluent entre autres des gènes, des séquences d'ADN ou d'ARN codant soit pour des protéines (hormones, immunoglobulines enzymes ou autres) lorsque les vecteurs rétroviraux de l'invention sont utilisés en thérapie génique, soit des protéines humaines ou non humaines (telles des protéines virales) lorsqu'il s'agit d'utiliser les vecteurs rétroviraux de l'invention dans le cadre de protocoles de vaccination. Les séquences nucléotidiques d'intérêt peuvent aussi être constituées en partie d'éléments de régulation (i.e. promoteur, activateur) homologues ou hétérologues à la cellule hôte d'une part et d'autre part de séquences codant pour tout ou partie d'un ou plusieurs gènes ou ADN complémentaire. De plus, les séquences nucléotides d'intérêt peuvent aussi coder un ARN antisens ou une séquence ribozyme.

Les applications possibles de la séquence de rétroéléments de la présente invention sont multiples. La séquence de l'invention est utilisée soit simplement pour l'insertion de séquences de nucléotides dans des cellules hôtes telles des cellules eucaryotes dans un environnement qui favorise une meilleure expression de ce gène, soit en thérapie génique,

soit en vaccination. A titre d'exemple, la séquence d'intérêt décrite dans Nature Medicine, Volume No. 7, Juillet 1995 correspondant à l'insérat des plasmides pMEPV_H/pMEPV_L ou pMEPV_H/pREPV_K peut être utilisée et le produit d'expression in vivo peut être un élément d'une composition thérapeutique.

Le vecteur rétroviral de l'invention est obtenu par la transfection d'une lignée cellulaire virale transcomplémentante avec une séquence de rétroéléments de l'invention se présentant de façon préférée sous forme de plasmide et comprenant de façon préférée dans une de ses LTR et plus particulièrement dans sa LTR de droite une séquence de nucléotides d'intérêt ainsi qu'une séquence de reconnaissance. Le plasmide peut également contenir une séquence de nucléotides codant pour une recombinaise susceptible de reconnaître le site de reconnaissance située en amont ou en aval de la séquence d'intérêt, cette séquence de nucléotides étant avantageusement située entre les régions LTR3' et LTR5'. Une fois la transfection de la lignée cellulaire virale effectuée, on obtient un vecteur rétroviral qui peut être utilisé pour l'infection d'une cellule hôte dans laquelle on souhaite intégrer la séquence de nucléotides d'intérêt.

Le plasmide défini ci-dessus, ainsi que la méthode de transfection de la lignée cellulaire par ledit plasmide, entrent également dans le cadre de la présente invention.

L'invention concerne également une méthode ou procédé d'introduction de séquences de nucléotides d'intérêt dans une cellule hôte telle une cellule eucaryote. La méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend l'introduction d'une séquence correspondant à des rétroéléments tels que les régions U3, U5 et/ou R dans une cellule eucaryote, ladite séquence étant liée à une séquence nucléotidique d'intérêt. Cette méthode est caractérisée par une étape d'infection d'une cellule eucaryote par un vecteur rétroviral contenant la séquence rétrovirale de l'invention qui comprend la séquence de nucléotides à introduire dans la

cellule eucaryote, dans des conditions permettant l'intégration dans le génome cellulaire de la cellule d'une seule LTR du vecteur rétroviral contenant la séquence à introduire dans le génome de la cellule hôte et une seconde étape d'expression de la séquence d'intérêt puis les éléments du produit de celle-ci à partir de la cellule recombinée.

L'invention concerne également une méthode de traitement médical comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un vecteur rétroviral de l'invention comprenant une séquence de nucléotides comportant un gène susceptible d'être intégré dans le génome de certaines cellules cibles du malade. Les vecteurs rétroviraux de la présente invention peuvent donc être utilisés en thérapie génique.

L'invention concerne également un hôte cellulaire ayant intégré dans son génome une structure provirale comprenant une seule région LTR d'un rétrovirus. Cette séquence LTR comporte une copie unique d'une séquence de nucléotides d'intérêt. Plus particulièrement, l'hôte cellulaire de l'invention est une cellule eucaryote et la structure provirale est caractérisée en ce qu'elle est essentiellement libre de séquence PBS, de signal d'encapsidation et de dimérisation et/ou de PPT.

L'invention concerne aussi les hôtes cellulaires recombinants contenant la séquence unique LTR ou une partie de celle-ci et la séquence d'intérêt.

L'invention concerne également l'utilisation de la séquence de rétroéléments ou du vecteur rétroviral de l'invention dans la production dans des cellules hôtes de protéines codées par une séquence de nucléotides d'intérêt comprise dans cet ADN rétroviral ou dans le traitement médical d'un patient visant à intégrer une séquence de nucléotides d'intérêt dans le génome de cellules visées.

Plus particulièrement, la séquence de l'invention permet également le transfert de séquences de nucléotides codant pour des anticorps dans des cellules hôtes. On parle alors d'immunisation extracellulaire puisque les anticorps générés à partir de ces séquences produisent leur effet à

l'intérieur des cellules les ayant intégrées. Parmi les séquences de nucléotides codant pour des anticorps pouvant être intégrées dans des cellules hôtes en utilisant la séquence rétrovirale et le vecteur rétroviral de l'invention, on peut mentionner, à titre d'exemple non limitatif, les anticorps reconnaissant des protéines d'enveloppe de virus HIV, particulièrement les protéines gp.120 du virus HIV-1 et du virus HIV-2 ainsi que des anticorps permettant de bloquer la transcriptase inverse. De tels anticorps sont décrits entre autres dans la publication de Maciejewski et al (Nature Medicine, Volume No 7, juillet 1995). Le vecteur rétroviral de l'invention permettant une intégration plus efficace de ces séquences de nucléotides d'intérêt, l'efficacité thérapeutique de cette approche en est d'autant améliorée.

L'invention concerne donc l'utilisation de vecteurs rétroviraux comprenant une séquence de nucléotides d'intérêt codant pour un anticorps reconnaissant une protéine ou un fragment d'une protéine de virus HIV, ainsi qu'une séquence de nucléotides de reconnaissance, ces deux séquences de nucléotides étant situées dans une région pouvant être transférée dans des lymphocytes humains à la suite d'une infection. De façon préférée, ces deux séquences sont situées dans la région LTR3' du vecteur rétroviral.

L'invention concerne également une méthode ou procédé d'expression d'une molécule codée par une séquence de nucléotides d'intérêt dans une cellule hôte. La méthode comprend :

- l'infection de la cellule hôte par un vecteur rétroviral de l'invention comprenant la séquence de nucléotides d'intérêt ;
- la croissance de la cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de la séquence de nucléotides d'intérêt ; et
- l'obtention de la molécule désirée.

La séquence de nucléotides rétrovirale ainsi que les vecteurs rétroviraux de l'invention peuvent être utilisés de plusieurs façons pour permettre l'intégration de la séquence de nucléotides d'intérêt désirée. En

fait, les inventeurs ont démontré qu'il n'était pas nécessaire d'associer l'expression de la recombinaise directement au vecteur rétroviral, bien que les rendements d'intégration soient supérieurs lorsqu'une séquence nucléotidique codant pour la recombinaise est partie intégrante du vecteur.

5 Dans une première réalisation de l'invention, un vecteur rétroviral comprenant dans la région LTR3' ou LTR5' du vecteur rétroviral une première séquence de nucléotides comprenant une séquence de nucléotides d'intérêt ainsi qu'une séquence de reconnaissance située en aval ou en amont de la séquence d'intérêt, ainsi qu'une deuxième
10 séquence de nucléotides identique à la première séquence de nucléotides insérée dans la région LTR5' du vecteur, est introduit dans le génome d'une cellule hôte par infection. Un plasmide comprenant une séquence de nucléotides codant pour une recombinaise susceptible de reconnaître la séquence de reconnaissance est également introduite dans la cellule par
15 transfection. L'expression de la recombinaise par transfection transforme la structure d'un provirus à deux LTR à un provirus à une seule LTR. Dans ce type de réaction, environ 50% des transformants stables contiennent le provirus modifié. Ce résultat partiel peut s'expliquer par l'expression éphémère du plasmide comprenant la séquence de nucléotides codant
20 pour la recombinaise après la transfection, aboutissant à une recombinaison sans intégration.

Dans une seconde réalisation de l'invention, on utilise une séquence rétrovirale comprenant une séquence nucléotidique comprenant une séquence d'intérêt ainsi qu'une séquence de reconnaissance située en
25 aval ou en amont de cette séquence d'intérêt. La séquence complète est insérée dans la région LTR3' d'un rétrovirus. Le vecteur rétroviral ainsi obtenu est ensuite utilisé pour infecter une lignée cellulaire qui exprime constitutivement ou par induction une recombinaise susceptible de reconnaître la séquence de reconnaissance. L'efficacité d'un tel système
30 est élevée surtout lorsque le gène codant pour la recombinaise est exprimé dès le début de l'infection rétrovirale.

Dans un troisième mode de réalisation de l'invention, un vecteur rétroviral comprend une séquence de nucléotides insérée dans sa région LTR3'. Cette séquence de nucléotides comprend une séquence d'intérêt ainsi qu'une séquence de reconnaissance pouvant être reconnue par une recombinaise. La séquence de reconnaissance est située en aval ou en amont de la séquence d'intérêt. De plus, un gène codant pour une recombinaise ainsi qu'un promoteur sont intégrés dans le vecteur rétroviral entre les deux LTR de ce vecteur. Une lignée cellulaire est ensuite infectée par ce rétrovirus. Un tel vecteur rétroviral ne génère que des provirus à une seule LTR. L'efficacité de ce système est élevée puisque tous les événements intégrés et analysés ont cette structure. Le principal avantage d'un tel vecteur rétroviral est qu'il associe des événements de recombinaison réussis entre les deux LTR avec la délétion du gène codant pour la recombinaise. Par conséquent, les cellules infectées n'expriment la recombinaise qu'éphémèrement.

Dans une des réalisations préférentielles de l'invention, les inventeurs ont utilisé le système de recombinaise *Crelox* spécifique du site du bactériophage P1. Le site de reconnaissance *LoxP* a été inséré dans la LTR3' en amont de la séquence de nucléotides d'intérêt dans un vecteur de type Δ Enh, et le gène codant pour la recombinaise *cre* entre les deux LTR. Dans la lignée cellulaire productrice, la protéine Cre est exprimée à partir de la construction plasmidique provirale. Toutefois, puisque le plasmide ne contient qu'une seule cible *loxP*, il n'est pas recombiné par la protéine Cre. Après l'infection, le site *loxP* est dupliqué de la LTR3' dans la LTR5'. Ainsi, Cre recombine les deux sites *loxP* répétés directs, ce qui se traduit par la délétion de toutes les séquences comprises entre les deux *loxP*, y compris le PBS, le signal d'encapsidation et de dimérisation et la PPT. Ne reste alors intégré dans le génome cellulaire qu'une seule LTR contenant le gène rapporteur. Le gène *cre* est également perdu lors de la recombinaison.

Dans tous les modes de réalisation préférentiels décrits ci-dessus, la séquence de nucléotides d'intérêt, qui est généralement une séquence étrangère au rétrovirus, est introduite de façon avantageuse dans la région U3 de LTR3' de la séquence rétrovirale. En effet, la possibilité d'introduire des séquences, voire des unités transcriptionnelles complètes, dans la région U3 de LTR3' est très bien documentée. On peut cependant envisager l'introduction de séquences d'intérêt ailleurs que dans la région U3 de LTR3' du vecteur rétroviral. Des exemples incluent la région U5 du LTR5'. De plus, bien qu'il soit préférable que le site de reconnaissance soit situé immédiatement en aval ou en amont de la séquence de nucléotides d'intérêt, on peut également positionner cette séquence à une distance appréciable qui peut varier entre 32nt et 4.5- Kb sans affecter l'intégration finale de la séquence d'intérêt à la cellule visée.

La quantité de produits génétiques étrangers introduite dans la région U3 de l'ADN viral peut être élevée et dans certains cas supérieure à 4 kpb. Ces séquences peuvent même correspondre à une unité transcriptionnelle complète avec un promoteur indépendant, ce qui démontre la polyvalence de ces vecteurs.

La possibilité d'introduire des quantités considérables de produits génétiques étrangers dans la 3' LTR du vecteur rétroviral de l'invention fait de ce vecteur rétroviral un système de choix pour l'insertion de séquences de gènes dans des cellules, plus particulièrement dans des cellules eucaryotes. Plusieurs types de cellules eucaryotes peuvent ainsi être transformées. Parmi les cellules eucaryotes pouvant être utilisées dans le contexte de la présente invention, notons particulièrement les types de cellules suivants : NIH 3T3, BRL, HM1, D3, PLL4, LT.

Dans une des réalisations particulières de la présente invention, l'insertion d'une séquence de nucléotides codant pour un marqueur est prévue dans la région LTR3' du vecteur rétroviral. La présence de ce marqueur permet de prouver l'insertion du produit nouveau.

A titre d'exemples non limitatifs, les marqueurs suivants peuvent être utilisés : LacZ, GFP (green fluorescent protein), CD9, PAL (alkaline phosphatase) et HRP (Horse Radish Peroxydase).

5 Bien que le système de recombinaison Crelox constitue un système de choix pour le vecteur rétroviral de l'invention, d'autres systèmes de recombinaison peuvent également être utilisés. A titre d'exemples non limitatifs, les systèmes de recombinaison suivants sont utilisables : le système de levure FLP (dit « Flip ») et le système bactérien R.

10 Les vecteurs rétroviraux de l'invention fournissent donc un moyen de transfert efficace d'ADN dans des cellules hôtes. L'intégration provirale est précise et ne provoque pas de réarrangement chromosomique. La conception des vecteurs dupicateurs partait du principe que la transposition du gène dans la LTR5', à l'extérieur de l'unité transcriptionnelle rétrovirale, améliore son expression.

15 Bien que la présence du signal d'encapsidation rende possible la génération d'un virus compétent pour la réplication par recombinaison entre les séquences du rétrovirus et du provirus endogènes, que la présence de PPT et d'autres éléments en cis rendent la transposition possible et que la présence des séquences PBS puisse avoir des effets négatifs sur l'expression du transgène, tous ces événements sont très
20 improbables lorsqu'on utilise un vecteur rétroviral selon l'invention puisque toutes ces séquences virales sont délétées.

Le système des sLTR est un concept nouveau dans la construction des rétroéléments en général. Il existe de nombreux rétrovirus dont le
25 spectre d'hôte de la particule présente un intérêt mais pour lesquels la conception de vecteurs nécessite la présence de certaines séquences *cis* ou *trans* actives différentes de celles qui ont été citées précédemment qui permettent un assemblage correct du virion et lui permettent d'être infectieux, comme par exemple les virus humains VIH, HTLV ou le virus de chèvre CAEV. Une fois intégrés, les éléments *cis* ou *trans* régulateurs
30 deviennent inutiles pour le gène transduit mais ont des effets pathogènes

pour la cellule et augmentent significativement les probabilités de la
résurgence d'un virus sauvage. La nécessité de ce type de séquence pour
ce type de rétrovirus les rend pratiquement inutilisables pour un usage en
tant que vecteurs. L'application du système sLTR de la présente invention
pour ces rétrovirus permet d'envisager avec plus de sécurité et plus de
fiabilité transcriptionnelles un usage comme vecteurs pour la transduction de
gènes.

La présente invention sera nettement décrite en référence aux
exemples suivants non limitatifs et qui font référence aux figures
suivantes :

- la figure 1A représente la structure du plasmide pMloxPL ;
- la figure 1B représente la structure du provirus MloxPL résultant de
l'infection du rétrovirus MloxPL ;
- la figure 1C représente un provirus après la recombinaison induite
par cre utilisant les deux sites loxP à l'intérieur des LTR ;
- la figure 1D représente une analyse par « Southern blot » de l'ADN
cellulaire provenant de fibroblastes NIH3T3 infectées par MloxPL ;
- la figure 1E présente une analyse par « Southern Blot » de l'ADN
cellulaire provenant du clone NIH3T3 MloxPL.1 transfecté par le plasmide
pMC1-Cre ;
- la figure 2A représente la structure et l'analyse moléculaire du
provirus MloxPL résultant de l'infection du rétrovirus MloxPL et de la
recombinaison induite par Cre utilisant les deux sites loxP à l'intérieur des
LTR ;
- la figure 2B représente les résultats d'une analyse par « Southern
blot » de l'ADN cellulaire provenant de fibroblastes NIH 3T3 Cre.1 infectés
par MloxPL avec digestion par l'endonuclease de restriction BclI ;
- la figure 2C représente les résultats d'une analyse par « Southern
blot » de l'ADN cellulaire provenant de fibroblastes NIH 3T3 Cre.1 infectés
par MloxPL avec digestion par les endonucleases ECORV ;
- la figure 3A représente la structure du plasmide pMCreloxPL ;

- la figure 3B représente un diagramme du 3' sLTR de quelques réalisations préférentielles du vecteur rétroviral de l'invention ;

- la figure 3C représente les résultats d'une analyse par « Southern blot » de l'ADN cellulaire provenant de fibroblastes NIH 3T3 infectées par MCreloxPL par digestion par l'endonuclease de restriction BclI ;

- la figure 3D représente les résultats d'une analyse par « Southern blot » de l'ADN cellulaire provenant de fibroblastes NIH 3T3 infectées par MCreloxPL par digestion par l'endonuclease de restriction EcoRV ;

- la figure 3E représente les résultats d'une analyse par « Southern blot » de l'ADN cellulaire provenant de fibroblastes NIH 3T3 infectées par MCreloxPL par digestion par l'endonuclease de restriction KpnI ;

- la figure 4 représente un schéma du mécanisme de la génération de sTLR avec le vecteur rétroviral MCreloxPL.

EXEMPLES

Nomenclature

La nomenclature des différents vecteurs et des différentes cellules a été établie comme suit : le p désigne le vecteur plasmidique (par exemple, pMloxPL) ; les noms avec un Ψ2 (déposée le 10/3/1993 à l'ECAC sous le numéro 93031002) désignent la lignée cellulaire du virus sauvage auxiliaire Ψ2 transfectée avec ce vecteur (par exemple, Ψ2-MloxPL) ; les noms sans p désignent les virus produits par les cellules du virus sauvage auxiliaire (par exemple, MloxPL) ; le nom d'une lignée cellulaire suivi du nom du virus indique que la lignée cellulaire contient un provirus résultant d'une infection (par exemple, NIH3T3MloxPL).

Culture et sélection des cellules

Les lignées cellulaires établies NIH 3T3 (fibroblastes de souris) et Ψ2 (lignée cellulaire d'encapsidation du rétrovirus écotrope de la souris) sont référencées dans (7) et (13). Elles sont cultivées dans un DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco) à teneur élevée en glucose (4,5 g/l) complété

avec du sérum de veau foetal à 5 %. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée, contenant 12% de CO₂. Du G418 est ajouté dans le milieu approprié à une concentration de 600 mg/ml. Le clonage de colonies résistant au G418 a été réalisé par pipettage de colonies individuelles et isolation dans une boîte de culture distincte. Le clonage des cellules infectées est réalisé par dilution limitante 48 heures après l'infection.

Transfection, infection, coloration des cellules et analyse des acides nucléiques par "Southern blot"

Des précipitations par phosphate de calcium ont été effectuées comme décrit dans (12). Le surnageant contenant le virus a été utilisé pour infecter des cellules NIH 3T3 en présence de 5 µg/ml de polybrène, comme décrit précédemment dans (37). Des hybridations par "Southern blot" ont été préparées par le procédé en référence (6). L'activité β-galactosidase a été mise en évidence par coloration au X-gal, comme décrit précédemment dans (38).

Détection de LacZ par PCR

La PCR est effectuée sur 1 µg d'ADN cellulaire génomique dans une réaction de 40 µl (Tris-HCl 50 mM (pH9), 150 µg/ml d'albumine de sérum bovin, (NH₄)₂OS₄ 16 mM, MgCl₂ 7 mM, 250 µM pour chaque dNTP, 1,25 U Taq DNApol (USB), 0,078 U Vent(exo+) DNApol (N.E. Biolabs)). Des amorces ont été ajoutées à une concentration finale de 0,25 µM (pour 20 mères). La réaction de la PCR a été chauffée à 80 °C pendant 5 minutes avant le début. 35 cycles (94°C, 55 min.; 59°C, 30 s; 70°C, 3 min. 30 s) avec les amorces suivantes : 5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT-3' et 5'-GACACCAGACCAATGGTAATGGTAGCGAC-3' pour la détection de LacZ et 5'-GGACTGGGTGGCTTCCAACTCCCAGACAC-3' et 5'-AGCTTCTCATTGCTGCGCGCCAGGTTTCAGG-3' pour la détection du

RAP-SYN endogène de souris, comme témoin interne. Les produits de réaction de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel.

Exemple 1 - Construction du vecteur rétroviral pMloxPL et transfection de lignées cellulaires

a) Construction du vecteur pMloxPL

pMloxPL résulte du plasmide pG-MPL (décrit dans Choulika *et al*, 1995), dans lequel le site de reconnaissance *loxP* est inséré à l'intérieur du site *Nco I* dans un adaptateur de liaison (5'-CATGCATATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATC-3' et 5'-CATGGATAACTTCGTATAATGTATGCTTATCGAAGTTATATG-3'), au lieu du site *I-Sce I*. La séquence du site *loxP* a été vérifiée par séquençage de l'ADN.

Le rétrovirus utilisé est illustré dans la Fig. 1a. pMloxPL est construit à partir d'un provirus de leucémie murine de Moloney défectif (dépourvu du gène *gag*, *pol* et *env*) en insérant la séquence codant pour *PhleoLacZ* dans la région U3 de la LTR de droite à la place des séquences d'activation à distance. 5' issu du gène *PhleoLacZ* a été positionné entre le site accepteur d'épissage du gène *env* de MoMuLV et un site *loxP* long de 32 pb issu du bactériophage P1. Dans les cellules infectées, ce type de virus a la LTR qui contient le gène activée par un promoteur cellulaire flanquant par piégeage du promoteur.

b) Transfection de lignées cellulaires avec le plasmide pMloxPL

Les lignées cellulaires produisant le virus ont été générées en transfectant le plasmide pMloxPL avec le plasmide de sélection pUSVneo dans la lignée cellulaire du virus sauvage auxiliaire Ψ2 qui exprime le virus sauvage auxiliaire écotrope défectif en encapsidation. Après sélection pour

G418 (néomycine), des clones individuels sélectionnés sur leur activité β -galactosidase ont été testés pour titrer le virus. La titration a été effectuée en clonant des cellules NIH 3T3 immédiatement après infection par dilution limitante, et en détectant la présence du provirus contenant *LacZ* par PCR.

5 Les lignées cellulaires productrices Ψ 2-MloxPL.1 et Ψ 2-MloxPL.2 ont montré un titre sur la lignée cellulaire NIH3T3 de respectivement $2,5 \times 10^4$ et 5×10^4 (Tableau 1). La titration des unités formant colonie bleue par millilitre (BCFU/ml) du surnageant viral de Ψ 2-MloxPL.1 et Ψ 2-MloxPL.2 est respectivement de 3 et 6, ce qui correspond à un rapport approximatif de 1

10 colonie bleue sur 10^4 intégrations. Comme nous l'avons décrit précédemment, ces provirus fonctionnent comme des pièges à promoteur, et seulement une intégration sur 10^4 exprime le gène rapporteur dans la ligne cellulaire fibroblastique NIH3T3.

Les structures de l'ADN des provirus MloxPL intégrés sont

15 schématisées à la figure 1b. Dans les figures du présent texte, les positions des LTR et des sites de restriction *Bcl*I et les tailles des fragments sont indiquées (x indique le fragment *Bcl*I de taille aléatoire du bras gauche et y le fragment *Bcl*I de taille aléatoire du bras droit. P indique une sonde *LacZ* radiomarquée au 32p. Ces structures ont ensuite été analysées par

20 hybridation par "Southern blot" dans 6 clones NIH 3T3 indépendants. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 1d. Tous les clones contiennent un provirus dans lequel les séquences à l'intérieur de la région U3 de la 3'LTR ont été dupliquées dans la 5'LTR ; la digestion par l'endonuclease *Bcl*I génère le fragment attendu de la part des provirus

25 avec deux LTR contenant *PhleoLacZ* (l'enzyme de restriction *Bcl*I a un site de reconnaissance dans chaque séquence *LacZ* dans les LTR). L'hybridation par "Southern blot", utilisant *LacZ* comme sonde, montre un fragment de clivage de 6 kpb démontrant une duplication fidèle de la région U3. Les deux bandes supplémentaires de tailles variables représentent des

30 fragments qui s'étendaient des sites *Bcl*I dans le provirus jusqu'à l'ADN

cellulaire flanquant. Les deux bandes supplémentaires montrent qu'il y a une intégration provirale par clone, et leurs tailles variables confirment que chaque lignée cellulaire était un clone indépendant.

5 Exemple 2 : Cotransfection de lignées cellulaires avec les plasmides
 pMloxPL et pMCI-Cre

 Nous avons examiné si la duplication *loxP* par l'intermédiaire de la LTR peut être recombinaison par la recombinaison Cre. Nous avons utilisé la
10 lignée cellulaire clonale NIH3T3MloxPL.1 pour cibler une recombinaison avec la protéine Cre. Nous avons cotransfecté dans cette lignée cellulaire le vecteur d'expression pMC1-Cre avec le vecteur de sélection pUSVneo. La structure du provirus après la recombinaison induite par Cre est illustrée à la figure 1c.

15 L'ADN de 24 clones résistant à la néomycine a été analysé par hybridation par "Southern blot". La détection des provirus recombinés a été réalisée en analysant les digestions de *Bcl* I. L'ADN restreint des clones a été sondé avec un *LacZ* radiomarqué au 32p. Les résultats de cette analyse sont illustrés à la figure 1e. La structure parentale du provirus
20 montre une bande de 6 kpb correspondant à la duplication fidèle de la séquence U3 contenant *LacZ* et deux bandes supplémentaires de 8 et 2 kpb (décrites ci-dessus (Fig. 1b & d)). L'analyse de l'ADN des clones résistant à la néomycine montre 5 clones sur 24 dans lesquels la bande de 6,0 kpb a été éliminée (Fig. 1e). Les bandes de 8 et 2 kpb correspondant à
25 l'ADN cellulaire flanquant le provirus étaient toujours présentes, montrant ainsi que le site d'intégration proviral n'a pas été réarrangé. Ce résultat suggère que l'expression du gène *cre* dans une cellule contenant le provirus MloxPL peut conduire à une recombinaison fréquente des deux sites *loxP* inclus dans les LTR.

30 Pour tester l'efficacité de la recombinaison par l'intermédiaire de *Cre/lox*, nous avons également analysé l'ADN de 25 clones résistant au

G418 par hybridation par "Southern blot" afin de tester la présence de la séquence *cre*). L'ADN a été digéré avec l'endonucléase de restriction *Xho* I et sondé avec un ADN *cre* pleine longueur radiomarké au 32p. Les résultats de cette analyse sont illustrés à la figure 1e. Trois des cinq clones recombinaisonnés en *loxP* montrent une bande s'hybridant avec la sonde *cre* de 1,9 kpb suggérant que l'unité d'expression *cre* pleine longueur de pMC1-Cre est présente. Un des cinq clones recombinaisonnés en *loxP* ne montrait pas de bande s'hybridant avec la sonde *cre*. Un clone recombinaisonné en *loxP* montre une bande de 5 kpb résultant d'un réarrangement du plasmide pMC1-Cre. Quatre autres clones montrant une bande de 1,9 kpb s'hybridant avec *cre* ne présentent pas de recombinaison dans le provirus intégré MloxPL. Nous n'avons pas détecté la présence d'ADN *cre* dans les 16 clones restants. Ce résultat montre que l'efficacité de la recombinaison induite par la présence du plasmide pMC1-Cre n'est pas absolue dans les lignées cellulaires transfectées stables, où seulement 50% des sites *loxP* sont recombinaisonnés. Ce résultat suggère également que la recombinaison entre les deux sites *loxP* peut être obtenue par l'expression éphémère de pMC1-Cre (Tableau 2).

Exemple 3 - Infection des cellules exprimant l'enzyme Cre avec MloxPL.

Nous avons produit une lignée cellulaire NIH3T3 contenant le plasmide pMC1-Cre, par cotransfection des plasmides pMC1-Cre et pUSVneo. Des clones ont été sélectionnés dans un milieu contenant du G418 et leur ADN a été analysé après digestion avec une endonucléase de restriction *Xho* I par hybridation par "Southern blot". La présence du gène *Cre* a été détectée par hybridation avec une sonde d'ADN *cre* pleine longueur radiomarkée au 32p. Dix des 12 clones résistant au G418 analysés ont révélé la présence de la séquence *Cre* sous un nombre variable de copies (allant approximativement de 1 à 10 copie(s))(données non illustrées).

Nous avons choisi le clone NIH3T3Cre.1 contenant approximativement 10 copies du plasmide pMC1-Cre à des fins d'analyse complémentaire. Nous avons infecté le clone NIH3T3Cre.1 avec le virus MloxPL. Les clones ont été isolés par dilution limitante.

5 La structure du provirus résultant de l'infection du rétrovirus MloxPL et de la recombinaison induite par Cre est illustrée à la figure 2a. La structure du vecteur intégré est une LTR solitaire (sLTR). Il manque une LTR et toutes les séquences situées entre les deux LTR dans les provirus intégrés (Fig. 2a & c).

10 La structure de l'ADN des provirus MloxPL a été analysée par hybridation par "Southern blot" après digestion par l'endonucléase de restriction *Bcl* I de leur ADN cellulaire afin de détecter la présence, ou l'absence, de LTR dupliquées dans la structure provirale. Tel que démontré à la figure 2b, l'analyse des 12 clones résultant de l'infection de
15 NIH3T3Cre.1 par MloxPL a montré l'absence dans tous les clones de la bande de 6 kpb indicatrice de la duplication.

Pour démontrer l'absence de la 5'LTR dans le provirus, une restriction de l'ADN par *EcoR* V a été réalisée. L'hybridation par "Southern blot" de l'ADN de NIH3T3Cre.1.MloxPL, restreint par l'endonucléase *EcoR*
20 V en utilisant une sonde *LacZ* radiomarquée (Fig. 2a & c), montre la présence d'une bande de 2,1 kpb et d'une bande de taille aléatoire. L'absence d'une bande de 3,9 kpb démontre l'absence d'une 5'LTR.

Exemple 4 - Construction du vecteur rétroviral pMcreloxPL et transfection
de lignées cellulaires

a) Construction du plasmide pMcreloxPL

5

La structure de rétrovirus utilisé dans le présent exemple est illustrée à la Fig. 3a. pMcreloxPL résulte de l'insertion du gène *cre* de 1.3 kpb fusionné avec une localisation nucléaire du gros antigène T du virus simien 40, entre les deux LTR du plasmide pMloxPL. Le gène *cre* est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène de la thymidine kinase (*tk*) du virus herpès simplex flanqué par une duplication de l'activateur à distance du virus du polyome mutant PYF441 avec des adaptateurs de liaison au niveau du site PstI de pMloxPL. La séquence *Cre* est dans la même orientation que le génome viral. Le plasmide pMcreloxPL a été déposé à la

10

15

CNCM le 13 juin 1995 no I-1599.

b) Transfection de lignées cellulaires avec le plasmide pMcreloxPL

Des lignées cellulaires produisant le virus ont été générées en cotransfectant le plasmide pMcreloxPL avec le plasmide de sélection pUSVneo dans la lignée cellulaire d'encapsidation Ψ2. Après sélection des cellules Ψ2 transfectées dans un milieu contenant du G418, des clones individuels ont été sélectionnés pour la production d'un rétrovirus exprimant *LacZ*. Un clone a produit un virus infectieux ; ce clone a été appelé Ψ2-McreloxPL.1. Dans Ψ2-McreloxPL.1, le plasmide pMcreloxPL a été intégré en une seule copie dans le génome cellulaire hôte (données non illustrées). Les lignées cellulaires productrices de Ψ2-McreloxPL.1 produisent 1×10^4 virus infectieux par millilitre ; la présence du gène *LacZ* est détectée par PCR (Tableau 1). La titration des unités formant colonie bleue par millilitre (BCFU/ml) du surnageant viral de Ψ2-McreloxPL.1 est

20

25

30

de 3 BCFU/ml, ce qui correspond comme prévu à une diminution

approximative de 10^4 par rapport à la titration par PCR. La production de Ψ 2-MCreloxPL était d'une efficacité basse comparée à la production de Ψ 2-MloxPL, un seul clone producteur ayant été récupéré après plusieurs expériences de cotransfection. Ce clone avait intégré une seule copie de la construction plasmidique virale. Nous en avons déduit que les cellules qui intègrent plus d'une copie du plasmide ne peuvent pas être récupérées en raison de la présence de l'activité recombinase qui modifie les transgènes intégrés.

c) Structure provirale de MCreloxPL

L'isolation de cellules NIH 3T3 infectées avec MCreloxPL a été réalisée par dilution limitante, après infection à une multiplicité de 0,5 particule virale par cellule. La structure du provirus résultant de l'infection du rétrovirus pMCreloxPL est illustrée à la figure 3b. Dans cette figure, α indique le fragment de taille aléatoire du bras gauche.

La structure de l'ADN des provirus intégrés a été analysée par hybridation par "Southern blot" dans 6 clones NIH3T3MCreloxPL indépendants. L'analyse par "Southern blot" de l'ADN proviral restreint par les endonucléases *Bcl* I et détecté avec une sonde *LacZ* radiomarquée a généré deux fragments de tailles variables, et ces clones n'ont pas généré de bande de 7,5 kpb supplémentaire (Figure 3c). L'absence de ce fragment supplémentaire de 7,5 kpb démontre la présence d'une seule LTR contenant *PhleoLacZ*. Pour établir en plus que la structure provirale correspond à une seule LTR, une analyse supplémentaire a été entreprise. Pour démontrer définitivement l'absence d'une 5'LTR dans le provirus, une restriction par *EcoR* V de l'ADN cellulaire a été réalisée. L'hybridation par "Southern blot" de l'ADN de NIH3T3MCreloxPL, restreint par l'endonucléase *EcoR* V en utilisant une sonde *LacZ* radiomarquée (Fig. 3d), montre la présence d'une bande de 2,1 kpb et d'une bande de taille aléatoire. L'absence d'une bande de 6 kpb démontre l'absence d'une

5'LTR. Ce "blot" a alors été hybridé avec une sonde *cre* radiomarquée. L'absence d'une bande dans l'ADN de NIH3T3MCreloxPL montre que l'ADN proviral est dépourvu du gène *cre* (Fig. 3d). Finalement, pour établir que la structure de la LTR restante n'était pas réarrangée, l'ADN de NIH3T3MCreloxPL a été restreint par l'endonucléase *Kpn* I et sondé avec un ADN de *LacZ* radiomarqué. Un fragment de 4,3 kpb a été observé dans tous les cas, montrant que la LTR *PhleoLacZ* était de la taille attendue (Fig. 3e). En conséquence, tous les clones isolés contenaient un provirus intégré avec une seule LTR non-réarrangée.

TABLEAU 1. Titres des lignées cellulaires Ψ2 MloxPL et MCreloxPL^a.

Clone	IP/ml ^b (10 ⁴)	BCF/ml ^c	Rapport ^d (10 ⁻⁴)
Ψ2-MloxPL.1	2,5	3	1,2
Ψ2-MloxPL.2	5	6	1,2
Ψ2-MCreloxPL.1	1	3	3

^aClones résistant au G418 provenant du clone NIH3T3MloxPL.1 cotransfecté avec pMC1-Cre et pUSVneo.

^bIndique la présence de la séquence pMC1-Cre.

(+)Indique la présence d'un fragment *Xho* I de 1,9 kpb correct issu de pMC1-Cre détecté avec une sonde *cre* radiomarquée au ³²P.

(*)Indique la présence d'un fragment *Xho* I s'hybridant avec la sonde *cre* radiomarquée au ³²P, mais d'une taille incorrecte.

(-)Indique l'absence du plasmide pMC1-Cre.

^cRésultats de la recombinaison *loxP* par l'intermédiaire de Cre détectée par analyse par "Southern blot".

TABLEAU 2. Recombinaison *loxP* par l'intermédiaire d'une transfection pMC1-Cre.

Nombre de clones résistant au G418 ^a	Présence de pMC1-Cre ^b	Recombinaison <i>loxP</i> ^c
3	+	+
1	-	+
1	*	+
4	+	-
16	-	-

^aDes cellules Ψ2 ont été transfectées respectivement avec soit pMloxPL+pUSVneo, soit pMCrelloxPL+pUSVneo, des clones résistants au G418 ont été sélectionnés dans un milieu contenant du G418. Des stocks de virus ont été préparés en incubant 8 ml de milieu avec 5×10^6 cellules de chaque clone résistant au G418, 5×10^4 cellules NIH 3T3 ont été soumises à diverses dilutions de virus pendant 8 heures et ensuite clonées par dilution limitante ou testées pour leur activité β-galactosidase par coloration par X-gal.

^bLes titres ont été calculés par le rapport entre les clones infectés isolés après clonage et détectés par PCR (IP : particule infectieuse) et les clones non-infectés (PCR+/PCR-)/ 1×10^5 .

^cBCFU est l'acronyme de "blue colony forming unit" (unité formant colonie bleue). Les BCFU sont des infections aboutissant à un piège du gène qui active le gène *PhleoLacZ* détecté par coloration par X-gal.

^dLe rapport est le nombre de BCFU par clone infecté.

Bibliographie

1. Barker, D. D., H. Wu, S. Hartung, M. Breindl, and R. Jaenisch. 1991. Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Mol. Cell. Biol.* 11:5154-5163.
2. Choi, S. Y., and D. V. Faller. 1994. The long terminal repeats of a murine retrovirus encode a trans-activator for cellular genes. *J. Biol. Chem.* 269:19691-19694.
3. Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon, and J. F. Nicolas. 1994. Site-specific induction of homologous recombination in mammalian cells by I-Sce I system of *Saccharomyces cerevisiae*. Submitted to Science
4. Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon, and J. F. Nicolas. 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-Sce I system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15:1968-1973.
5. Chu, T.-H. T., and R. Dornburg. 1995. Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J. Virol.* 69:2659-2663.
6. Church, G. M., and W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.
7. Eychene, A., C. Bechade, M. Marx, D. Laugier, P. Dezelee, and G. Calothy. 1990. Molecular and biological properties of c-mil transducing retroviruses generated during passage of Rous-associated virus type 1 in chicken neuroretina cells. *J. Virol.* 64:231-8.
8. Felder, M. P., A. Eychene, J. V. Barnier, I. Calogeraki, G. Calothy, and M. Marx. 1991. Common mechanism of retrovirus activation and transduction of c-mil and c-Rmil in chicken neuroretina cells infected with Rous-associated virus type 1. *J. Virol.* 65:3633-40.
9. Feuer, G., M. Taketo, R. C. Hanecak, and H. Fan. 1989. Two blocks in Moloney murine leukemia virus expression in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells as determined by transient expression assays. *J. Virol.* 63:2317-2324.
10. Flanagan, J. R., K. G. Becker, D. L. Ennist, S. L. Gleason, P. H. Driggers, B. Z. Levi, E. Appella, and K. Ozato. 1992. Cloning of a negative transcription factor that binds to upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol. Cell Biol.* 12:38-44.
11. Gama Sosa, M. A., D. H. Rosas, R. DeGasperi, E. Morita, M. R. Hutchinson, and R. Ruprecht. 1994. Negative regulation of the 5' long terminal repeat (LTR) by the 3' LTR in the murine proviral genome. *Mol. Cell. Biol.* 14:2662-2670.
12. Graham, F. L., and A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.

13. Gu, H., Y. R. Zou, and K. Rajewsky. 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-*loxP*-mediated gene targeting. *Cell* 73:1155-1164.
14. Hanley, T., and J. P. Merlie. 1991. Transgene detection in unpurified mouse tail DNA by polymerase chain reaction. *BioTechniques* 10:56.
15. Hantzopoulos, P. A., B. A. Sullenger, G. Ungers, and E. Gilboa. 1989. Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3519-3523.
16. Hoebe, R. C., A. A. Migchielsen, d. J. R. van, O. H. van, and d. E. A. van. 1991. Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J Virol* 65:904-12.
17. Joyner, A. L. 1991. Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells : New approaches to mammalian development. *BioEssays* 13:649-656.
18. Kasahara, N., A. M. Dozy, and Y. W. Kan. 1994. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266:1373-1376.
19. Kilby, N. J., M. R. Snaith, and J. A. H. Murray. 1993. Site-specific recombinases : tools for genome engineering. *Reviews* 9:413-421.
20. Linney, E., B. Davis, J. Overhauser, E. Chao, and H. Fan. 1984. Non-function of Moloney murine leukaemia virus regulatory sequence in F9 embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3748-3752.
21. Lochet, M., M. Aboud, and R. M. Flugel. 1993. Increase in the basal transcriptional activity of the human foamy virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *NAR* 21:4226-4230.
22. Loh, T. P., L. L. Sievert, and R. W. Scott. 1988. Negative regulation of retrovirus expression in embryonal carcinoma cells mediated by an intragenic domain. *J. Virol.* 62:4086-4095.
23. Loh, T. P., L. L. Sievert, and R. W. Scott. 1990. Evidence for a stem cell-specific repressor of moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 10:4045-4057.
24. Loh, T. P., L. L. Sivert, and R. W. Scott. 1987. Proviral sequences that restrict retroviral expression in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:3775-3784.
25. Mann, R., R. C. Mulligan, and D. Baltimore. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33:153-160.

26. Mansour, S. L., K. R. Thomas, and C. M.R. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.
27. Miller, A. D., D. R. Trauber, and C. Buttimore. 1986. Factors involved in the production of helper virus-free retrovirus vector. *Somatic Cell. Mol. Genet.* 12:175-183.
28. Morgan, R. A., L. Couture, O.-Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, and W. F. Anderson. 1992. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: developement of a polycistronic gene transfer and applications to human gene therapy. *N.A.R.* 20:1293-1299.
29. Nicolas, J. F., and C. Bonnerot. 1993. Répression et activation des rétrovirus murins dans les cellules totipotentes. *Médecine/Sciences* 9:191-197.
30. Nicolas, J. F., and J. Rubenstein. 1987. Retroviral vectors, p. 493-512. *In* E. Biotechnology series - Julian E. Davies (ed.), *Vectors : A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworths, Boston London Durban Singapore Sydney Toronto Wellington.
31. Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8392-8396.
32. Peters, G., A. E. Lee, and C. Dickson. 1986. Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature* 320:628-631.
33. Petersen, R., G. Kempler, and E. Barklis. 1991. A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol. Cel. Biol.* 11:1214-1221.
34. Pulsinelli, G. A., and H. M. Temin. 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication : novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J. Virol.* 65:4786-4797.
35. Reddy, S., J. V. DeGregori, H. Von Melchner, and H. E. Ruley. 1991. Retrovirus promoter-trap vector to induce LacZ gene fusions in mammalian cells. *J. Virol.* 65:1507-1515.
36. Reddy, S., H. Rayburn, V. M. H., and R. H. E. 1992. Fluorescence-activated sorting of totipotent embryonic stem cells expressing developmentally regulated *lacZ* fusion genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6721-6725.
37. Rubenstein, J., J. F. Nicolas, and F. Jacob. 1984. Construction of a retrovirus capable of transducing and expressing genes in multipotential embryonic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7137-7140.

38. Sanes, J., J. Rubenstein, and J. F. Nicolas. 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* 5:3133-3142.
39. Sauer, B. 1987. Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7:2087-2096.
40. Sauer, B., and N. Henderson. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166-5170.
41. Savatier, N., D. Rocancourt, C. Bonnerot, and J.-F. Nicolas. 1989. A novel system for screening antiretroviral agents. *J. Virol.* 26:229-236.
42. Shafer, G. E., D. W. Emery, K. Gustafsson, S. Germana, W. F. Anderson, D. H. Sachs, and C. LeGuern. 1991. Expression of a swine class II gene in murine bone marrow hematopoietic cells by retroviral mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9760-9764.
43. Sternberg, N., B. Sauer, R. Hoess, and K. Abremski. 1986. Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoter and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* 187:197-212.
44. Stevenson, M., S. Haggerty, C. A. Lamonica, C. M. Meier, S. K. Welch, and A. J. Wasiak. 1990. Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J. Virol.* 64:2421-2425.
45. Stuhlmann, H., and P. Berg. 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J. Virol.* 66:2378-2388.
46. Swanstrom, R., R. C. Parker, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1983. Transduction of a cellular oncogene : the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2519-2523.
47. Takeuchi, Y., G. Simpson, R. G. Vile, R. A. Weiss, and M. K. Collins. 1992. Retroviral pseudotypes produced by rescue of a Moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retrovirus. *Virology* 186:792-794.
48. Trambly, P. J., C. A. Kozak, and P. Jolicœur. 1992. Identification of a novel gene, *Vin-1*, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *J. Virol.* 66:1344-1353.
49. Trusko, S. P., E. K. Hoffman, and D. L. George. 1989. Transcriptional activation of cKi-ras proto-oncogene resulting from retroviral promoter insertion. *N.A.R.* 17:9259-9265.
50. Varela-Echavarria, A., C. M. Prorock, Y. Ron, and J. P. Dougherty. 1993. High rate of genetic rearrangement during replication of Moloney murine leukemia virus-based vector. *J. Virol.* 67:6357-6364.

51. von Melchner, H., and H. E. Ruley. 1989. Identification of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *J. Virol.* 63:3227-3233.
52. Weiss, R., N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin. 1985. RNA tumor viruses., p. 1222. (ed.), *Molecular Biology of tumor viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory.,
53. Yee, Y. K., J. C. Moores, D. J. Jolly, J. A. Wolff, J. G. Respass, and T. Friedmann. 1987. Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5197-5201.

REVENDICATIONS

1. Séquence de rétroéléments naturels ou synthétiques, particulièrement d'ADN rétroviral, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'insertion incorporée dans une région pouvant être transférée
5 dans une cellule cible et intégrée dans un provirus recombinant lors d'une infection de ladite cellule cible par un rétrovirus comprenant ladite séquence de rétroéléments, ladite séquence d'insertion comprenant une séquence de nucléotides d'intérêt pouvant être intégrée dans le génome d'une cellule cible ainsi qu'une séquence de reconnaissance, de
10 préférence une seule séquence de reconnaissance pouvant être reconnue par une recombinaise.

2. Séquence de rétroéléments selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite séquence d'insertion est incorporée dans une région agissant en cis de ladite séquence de rétroéléments.

15 3. Séquence de rétroéléments selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite séquence d'insertion est incorporée dans la région LTR3' ou LTR5' de ladite séquence de rétroéléments.

20 4. Séquence de rétroéléments selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite séquence d'insertion est incorporée dans la région U3 du LTR3', U5 du LTR5', ou R de ladite séquence rétrovirale.

5. Séquence de rétroéléments selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que ladite séquence de reconnaissance pouvant être reconnue par une recombinaise est située en amont de ladite séquence de nucléotides d'intérêt.

25 6. Séquence de rétroéléments selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides codant pour une recombinaise susceptible de reconnaître lesdits sites de reconnaissance.

30 7. Séquence de rétroéléments selon la revendication 6 caractérisée en ce que la séquence de nucléotides codant pour une

recombinase est située entre les régions LTR5' et LTR3' de ladite séquence de rétroéléments.

8. Séquence de rétroéléments selon la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que la séquence de nucléotides codant pour une recombina

5 recombina

9. Séquence de rétroéléments selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence de reconnaissance comprend le site de reconnaissance LoxP.

10. Séquence de rétroéléments selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence de nucléotides d'intérêt comprend une séquence codant pour une protéine ou un ARN d'intérêt, particulièrement un ARN antisens ou une séquence ribozyme.

11. Séquence de rétroéléments contenue dans le plasmide déposé le 13 juin 1995 à la CNCM n° I-1599.

12. Vecteur rétroviral caractérisé en ce qu'il comprend une séquence de rétroéléments selon l'une quelconque des revendications précédentes.

13. Vecteur rétroviral selon la revendication 12 caractérisé en ce que ledit vecteur est un provirus de leucémie murine de Moloney défectif comprenant ledit site de reconnaissance dans sa région U3 du LTR3', U5 du LTR5' ou R.

14. Hôte cellulaire ayant intégré dans son génome une structure provirale comprenant une seule séquence LTR d'un vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13, ladite séquence LTR comportant une copie unique d'une séquence de nucléotides d'intérêt.

15. Hôte cellulaire selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote dont la structure provirale est essentiellement libre de séquences PBS, de signal d'encapsulation et de dimérisation et de PPT.

16. Méthode d'introduction d'un gène dans une cellule hôte, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend l'infection de ladite cellule hôte par le vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13.

5 17. Méthode d'expression d'une molécule aidée par une séquence d'intérêt dans une cellule hôte, ladite méthode étant caractérisée en ce qu'elle comprend :

- l'infection de ladite cellule hôte par un vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13 comprenant ladite séquence de nucléotides d'intérêt ;
- 10 - la croissance de ladite cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence de nucléotides d'intérêt; et
- l'obtention de la molécule désirée.

15 18. Utilisation d'une séquence rétrovirale selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans la production par des cellules hôtes de protéines ou d'ARNs codés par une séquence de nucléotides d'intérêt.

20 19. Utilisation d'un vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13 en la production par des cellules hôtes de protéines codées par une séquence de nucléotides d'intérêt.

25 20. Utilisation d'une séquence rétrovirale selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans le traitement médical d'un patient visant à intégrer une séquence de nucléotides d'intérêt dans le génome de cellules visées.

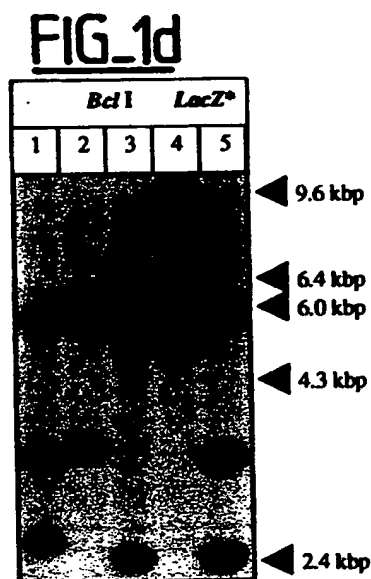
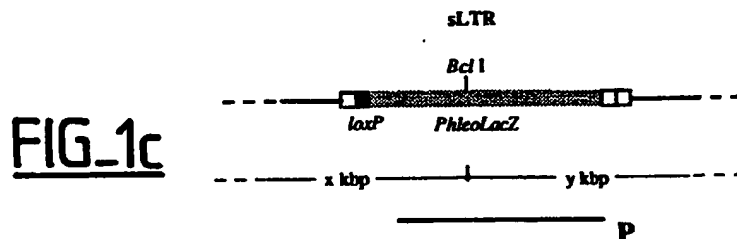
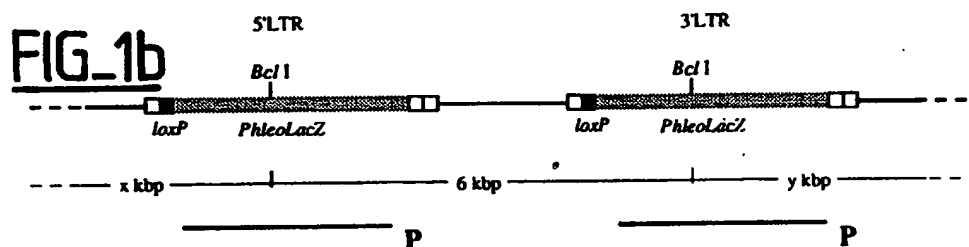
21. Utilisation d'un vecteur rétroviral selon la revendication 12 à 13 dans le traitement médical d'un patient visant à intégrer une séquence de nucléotides d'intérêt dans le génome de cellules cibles.

30 22. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13 en combinaison avec un excipient pharmaceutique acceptable.

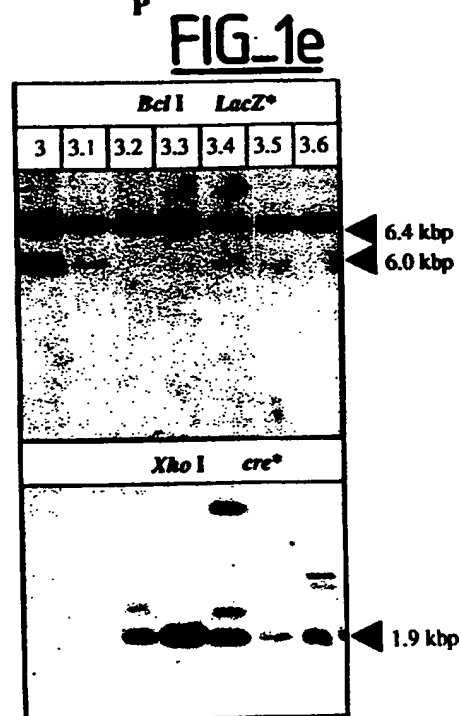
23. Utilisation de la composition selon la revendication 22 en vue d'intégrer une séquence de nucléotides d'intérêt comprenant une séquence de nucléotides susceptibles d'être exprimés dans le génome de cellules cibles, ladite composition étant constituée par une quantité efficace d'un vecteur rétroviral selon la revendication 12 ou 13.

24. Composition pharmaceutique constituée de cellules hôtes selon la revendication 14.

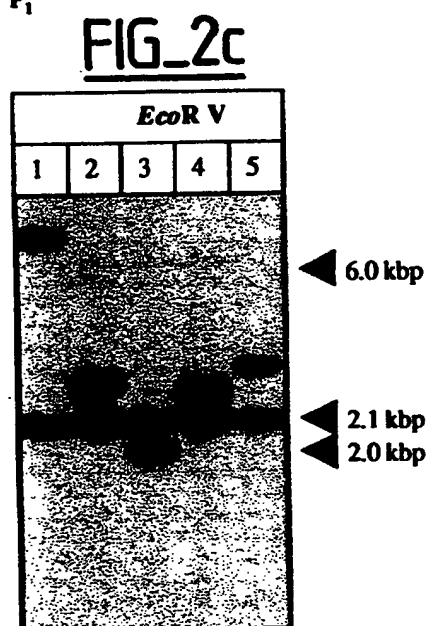
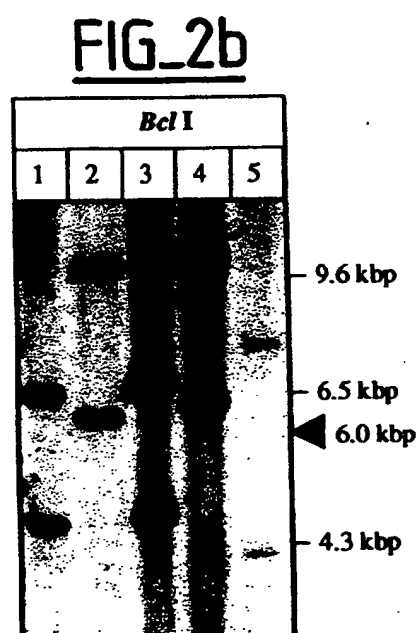
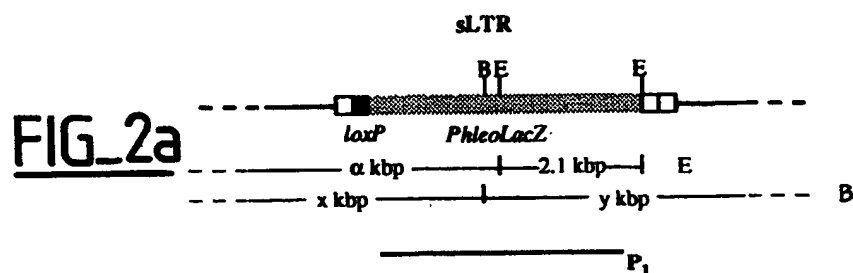
1 / 4



LTR	$x \geq 1.8$ kbp
<i>PhleoLacZ</i>	$y \geq 2.5$ kbp
<i>loxP</i>	
ADN cellulaire	

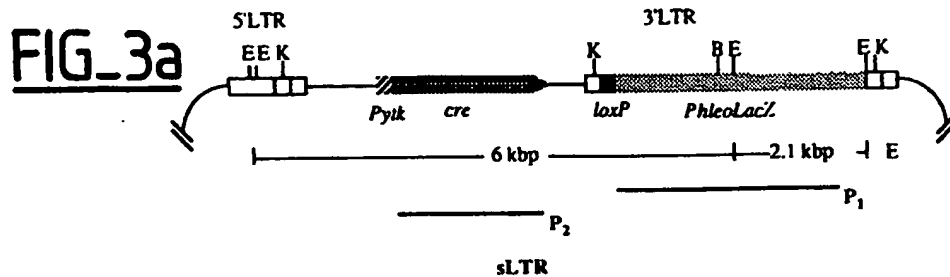
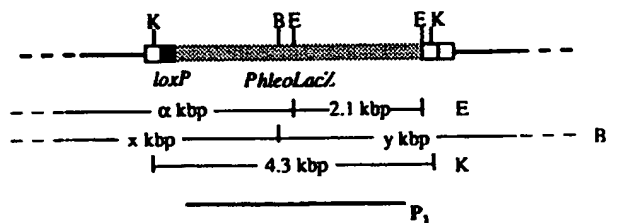
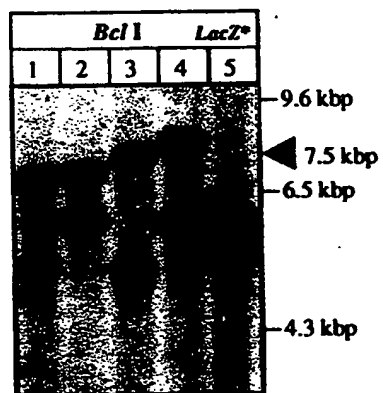
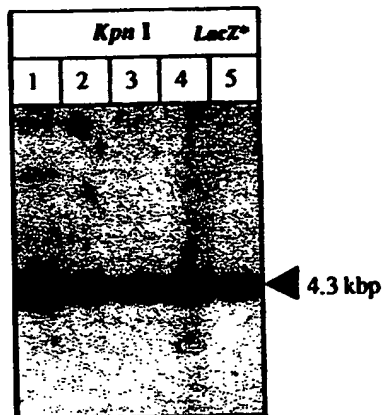
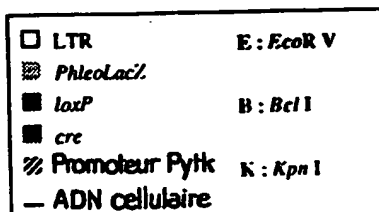
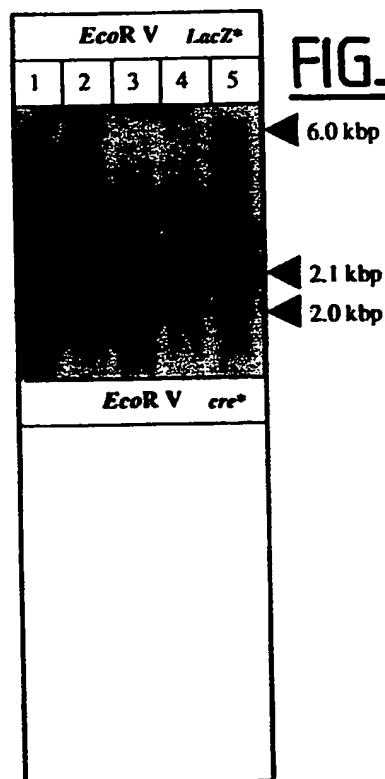


2 / 4



<input type="checkbox"/> LTR	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>PhleoLacZ</i>	E : <i>EcoR</i> V
<input checked="" type="checkbox"/> <i>loxP</i>	B : <i>Bcl</i> I
— ADN cellulaire	
x ≥ 1.8 kbp	α ≥ 1.9 kbp
y ≥ 2.5 kbp	

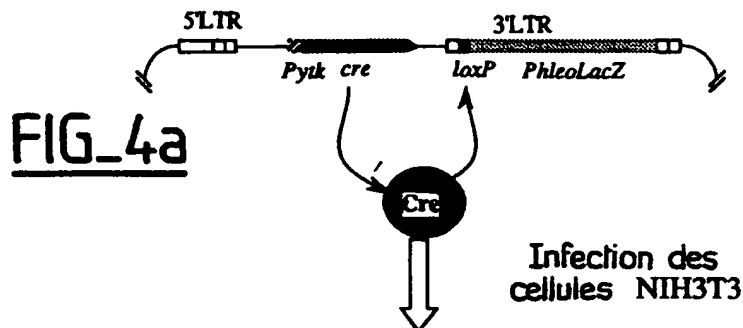
3 / 4

**FIG_3b****FIG_3c****FIG_3e****FIG_3d**

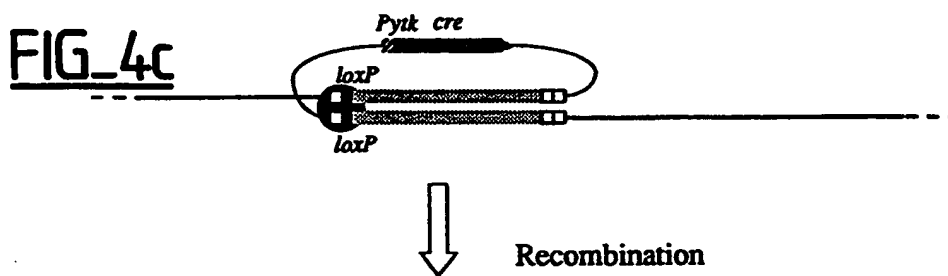
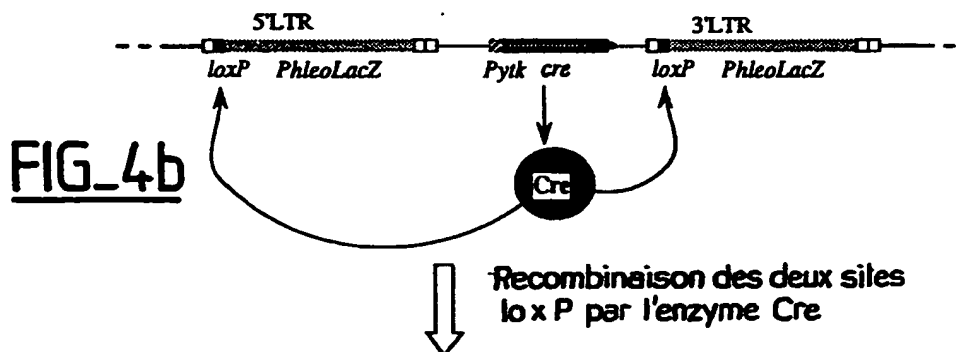
x ≥ 1.8 kbp
y ≥ 2.5 kbp α ≥ 1.9 kbp

4 / 4

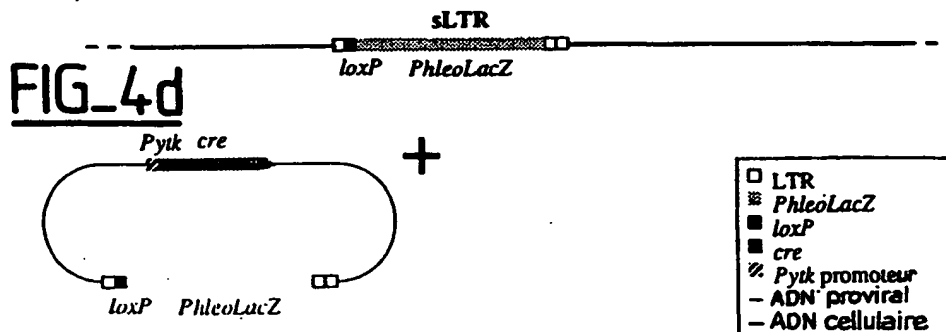
Transfection de la lignée cellulaire
transcomplémentante ψ -2 avec le plasmide



Intégration du provirus
MCreloxPL dans la lignée cellulaire
NIH3T3



Le résultat de la recombinaison
par l'intermédiaire de Cre-lox est une sLTR



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/01178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 07943 (SOMATIX THERAPY CORPORATION) 14 May 1992 see page 16, line 20 - line 25; example 7 ---	1-4, 12-24
A	EP,A,0 300 422 (E.I.DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 25 January 1989 see page 5, line 27 - line 30; claims 15,16 ---	5-11
A	EP,A,0 336 822 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 October 1989 see column 3, line 48 - line 61 --- -/--	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 1996

Date of mailing of the international search report

29. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/01178

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 3, March 1996, pages 1792-1798, XP002018612 A.CHOULIKA ET AL.: "Transfer of single gene-containing long terminal repeats into the genome of mammalian cells by a retroviral vector carrying the cre gene and the loxP site" see the whole document -----</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01178

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 20 and 21 (in their entirety) and 23 (in part) concern a method of treating the human or animal body, the search has been based on the effects claimed for the composition in question.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/01178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9207943	14-05-92	AU-B- 659824	01-06-95
		AU-A- 1266692	26-05-92
		AU-B- 656544	09-02-95
		AU-A- 9017591	26-05-92
		CA-A- 2095153	01-05-92
		CA-A- 2095256	01-05-92
		EP-A- 0568537	10-11-93
		EP-A- 0556345	25-08-93
		JP-T- 7503121	06-04-95
		JP-T- 6503968	12-05-94
		WO-A- 9207573	14-05-92
EP-A-300422	25-01-89	AU-B- 610608	23-05-91
		AU-A- 1920188	27-01-89
		DE-A- 3876327	14-01-93
		JP-A- 1112986	01-05-89
EP-A-336822	11-10-89	FR-A- 2629469	06-10-89
		AT-T- 109831	15-08-94
		DE-D- 68917349	15-09-94
		DE-T- 68917349	02-02-95
		ES-T- 2058565	01-11-94
		JP-A- 2013384	17-01-90
		PT-B- 90185	31-10-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PC, FR 96/01178

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,92 07943 (SOMATIX THERAPY CORPORATION) 14 Mai 1992 voir page 16, ligne 20 - ligne 25; exemple 7 ---	1-4, 12-24
A	EP,A,0 300 422 (E.I.DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 25 Janvier 1989 voir page 5, ligne 27 - ligne 30; revendications 15,16 ---	5-11
A	EP,A,0 336 822 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11 Octobre 1989 voir colonne 3, ligne 48 - ligne 61 --- -/--	1-24
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">15 Novembre 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">29.11.96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Cupido, M</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCI/FR 96/01178

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 3, Mars 1996, pages 1792-1798, XP002018612 A.CHOULIKA ET AL.: "Transfer of single gene-containing long terminal repeats into the genome of mammalian cells by a retroviral vector carrying the cre gene and the loxP site" voir le document en entier -----</p>	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale n°

PCT/FR 96/01178

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Bien que les revendications 20 et 21 complètement et 23 partiellement

concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PC1/FR 96/01178

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9207943	14-05-92	AU-B- 659824	01-06-95
		AU-A- 1266692	26-05-92
		AU-B- 656544	09-02-95
		AU-A- 9017591	26-05-92
		CA-A- 2095153	01-05-92
		CA-A- 2095256	01-05-92
		EP-A- 0568537	10-11-93
		EP-A- 0556345	25-08-93
		JP-T- 7503121	06-04-95
		JP-T- 6503968	12-05-94
		WO-A- 9207573	14-05-92
EP-A-300422	25-01-89	AU-B- 610608	23-05-91
		AU-A- 1920188	27-01-89
		DE-A- 3876327	14-01-93
		JP-A- 1112986	01-05-89
EP-A-336822	11-10-89	FR-A- 2629469	06-10-89
		AT-T- 109831	15-08-94
		DE-D- 68917349	15-09-94
		DE-T- 68917349	02-02-95
		ES-T- 2058565	01-11-94
		JP-A- 2013384	17-01-90
		PT-B- 90185	31-10-94